

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Genetika és Biotechnológiai Intézet

MANGALICA-FAJTASPECIFIKUS DNS MARKER FEJLESZTÉSE

Készítette: Németh Andrea
Évfolyam: Mezőgazdasági biotechnológus MSc II. évfolyam

Belső konzulens: Dr. Bodó Szilárd
Beosztása: egyetemi docens

Külső konzulens: Dr. Stéger Viktor
Beosztása: tudományos munkatárs

Külső konzulens: Dr. Marincs Ferenc
Beosztása: tudományos főmunkatárs

Gödöllő
2014

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK.....	1
1 RÖVIDÍTÉSE JEGYZÉKE	4
2 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS	5
3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
3.1 A mangalica	7
3.1.1 A mangalica eredete.....	7
3.1.2 A mangalica fajták jellemzése	7
3.1.3 A mangalica magyarországi helyzete	9
3.1.4 A mangalica értékmérő tulajdonságai és gazdasági jelentősége.....	10
3.2 Genom programok	12
3.2.1 Nemzetközi sertés genom projektek	12
3.2.2 Hazai sertés genom projektek	13
3.3 Szekvenálási módszerek	14
3.3.1 Első generációs szekvenálás	14
3.3.2 Új generációs szekvenálási módszerek	14
3.4 Molekuláris markerek	16
4 ANYAG ÉS MÓDSZER	19
4.1 Bioinformatika	19
4.2 Biobanki minták.....	20
4.3 DNS izolálás	20
4.4 PCR reakciók és az adatok kiértékelése.....	21
5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	23
5.1 Bioinformatika	23
5.2 PCR optimalizálás és az M3 marker tesztelése.....	25
6 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	30

7	ÖSSZEFOGLALÁS.....	31
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	33
9	IRODALOMJEGYZÉK.....	34
10	MELLÉKLET	40
11	NYILATKOZAT	44

1 RÖVIDÍTÉSE JEGYZÉKE

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism/ Amplifikált Fragment-hossz Polimorfizmus
bp	bázispár
CNV	Copy Number Variant/ Kópiaszám variáció
ddNTP	dideoxi nukleotid trifoszfát
dNTP	deoxi nukleotid trifoszfát
EDTA	Etiléndiamil-tetraacetil
EtBr	Etídium-bromid
Gb	gigabázis (1 000 000 000 bp.)
HGP	Human Genome Program/ Humán Genom Program
IGV	Integrative Genomics Viewer
Indel	inszerció és delécio
Kb	kilobázis (1 000 bp)
MAS	Marker Assisted Selection/ Marker asszisztált szelekció
Mb	megabázis (1 000 000 bp)
MOE	Mangalicatenyésztők Országos Egyesülete
NGS	Next-Generation Sequencing/ Új Generációs Szekvenálás
NTP	nukleotid trifoszfát
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Polimeráz Láncreakció
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA/ Véletlen Amplifikált Polimorf DNS
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism/ Restrikciós Fragment-hossz Polimorfizmus
SGSC	Swine Genome Sequencing Consortium/ Sertés Genom Szekvenálási Konzorcium
SNP	Single Nucleotide Polymorphism/ Egy Nukleotidos Polimorfizmus
SOLiD	Supported Oligonucleotide Ligation and Detection/ Szekvenálás Oligonukleotid Ligálással és Detektálással
SV	Structural Variant/ strukturális variáció
TBE	tris, bórsav és EDTA puffer keverék

2 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A házi sertés (*Sus scrofa domestica*) az egyik legelterjedtebb gazdasági haszonállat a világon; a húsfogyasztás közel 40%-át a sertésből készült termékek adják. Mivel a sertéshús iránti igény folyamatosan növekszik, így a termelőknek új technológiákat és tenyésztési eljárásokat kell alkalmazniuk, hogy ki tudják elégíteni az egyre növekvő népesség és megváltozott étkezési szokások által támasztott fogyasztási igényeket. Ezzel felértékelődött, az intenzív tartási technológia, amely a nagy termelőképességű sertésfajták kialakulásának kedvezett, háttérbe szorítva a hagyományos fajtákat. Különösen érvényes ez a mangalicára, amely zsírsertésként a XIX. században még nagy gazdasági jelentőséggel bírt, majd a századfordulót követően népszerűsége fokozatosan csökkenni kezdett mivel a fogyasztói igények a hússertések iránti kereslet irányába mozdultak el, ami a modern fajták elterjedésének kedvezett.

A mangalica, több más régi mezőgazdasági állatunkkal együtt, sokáig veszélyeztetettnek fajtának számított, hiszen története során nemegyszer a kipusztulás veszélye fenyegette. A 90-es évektől a mangalica sertések száma jelentős növekedésnek indult, a génmegőrzési programoknak, az árutermelésbe való bevonásnak és a falusi turizmusnak köszönhetően (CSAPÓ et al. 1999, TÖRÖK 2011).

A mangalica húsa a zsírjában található kedvező zsírsavösszetételének köszönhetően ízletesebb, porhanyósabb (FLEGER 1999, CSAPÓ et al. 1999), így alkalmas prémium minőségű termékek előállítására. Ennek is köszönhető, hogy fontos exportcikküké vált többek között Spanyolországba, az USA-ba és Japánba.

A növekvő gazdasági jelentőség és kereslet hatására megnőtt a mangalicából készült hústermékek hamisítása is, így kiemelt fontosságú lett egy minőségellenőrzési rendszer kidolgozása. A mangalica és annak három színváltozatának genetikai tesztjét kidolgozták ZSOLNAI és munkatársai mikroszatellitek segítségével (2006), majd SNP szettek alkalmazásával is egy pontosabb módszert dolgoztak ki (2013). Továbbá az anyai úton öröklődő mitokondriális haplotípusok is felhasználhatóak egyes mangalica vonalak azonosítására MARINCS et al. (2013).

A nemzetközi tudományos életben a genomszekvenálási programok jelentősége, párhuzamosan az új generációs szekvenálási technikák fejlődésével, egyre növekszik. Ez a fejlődés lehetővé teszi, többek között, az örökletes genetikai rendellenességek és a faj vagy fajta azonosítás hatékonyabbá válását.

2009-ben elkészült, legnagyobbreszt a duroc fajtára alapozva, a sertés teljes referencia genomszekvenciája, amit egy nemzetközi megállapodás alapján nyilvánossá tettek UENISHI et al.

(2009). Ugyancsak 2009-ben indult el az első és máig egyetlen hazai haszonállat, a mangalica, genomprogramja a több kutatóintézet és vállalkozás részvételével megalakult MANGFOOD konzorcium keretében. A program során meghatározták a mangalica mindhárom fajtájának (színváltozatának) teljes genomját, majd a referencia szekvenciával összehasonlítva, bioinformatikai módszerek segítségével mangalicára jellemző strukturális különbségeket kerestek, ezzel megteremtve a lehetőséget a mangalica termékek nyomon követésére, hamisításának kiszűrésére és a fajta tisztaságának megőrzésére.

2012-ben 55 európai és ázsiai vad illetve házi sertés teljes genomszekvenciáját publikálták GROENON et al. (2012). Ezt a nyilvános adatbázist összehasonlítva a MANGFOOD konzorcium mangalica genom adataival lehetővé vált újabb szekvencia különbségek (deléciók, inszerciók) keresése mangalica és más sertésfajták között.

Noha van már mangalica fajták azonosítására DNS diagnosztika, az volt a feladatom, hogy az eddigi mangalica azonosítási módszerekre egy alternatív, olcsón és gyorsan kivitelezhető DNS diagnosztikai módszert dolgozzak ki. Céлом volt a nemzetközi adatbázisban elérhető 55 sertés teljes genomszekvenciák összehasonlítása a MANGFOOD konzorcium által meghatározott négy teljes sertésgenommal. Olyan eltéréseket vizsgálata, amelyek lehetővé teszik a mangalica fajták elválasztását a többi sertésfajtától és hibridtől. A különbségeket mutató genom szakaszok alapján mangalica-fajtaspecifikus markerként használható PCR alapú DNS diagnosztikai rendszer kialakítása, tesztelése.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A mangalica

3.1.1 A mangalica eredete

Hazánk régi magyar zsírsertés fajtája a mangalica, melynek ősei (szalontai-, bakonyi-, alföldi sertés) nagy valószínűséggel a Kárpát-medencében tartott lápi sertéstől származnak (EGERSZEGI et al. 2003a, MARINCS et al. 2013). Az 1800-as évek első felében József nádor tulajdonába került az első sumadia sertés állomány, amellyel megkezdte a bakonyi és szalontai sertések keresztezését, egy jobb minőségű zsírsertésfajta előállítására érdekében. Ezekből a keresztezésekkel alakult ki a ma is ismert mangalica sertés. Más források szerint (HANKÓ 1940, MATOLCSI 1975) már a sumadia sertés behozatala előtt is létezett egy göndör szőrű (mangalica) sertés hazánkban, amely nagy valószínűséggel a szerb-horvát területekről a bécsi vásárokból hajtott kondákból elszökött egyedek és a fentebb említett Kárpát-medencei fajták spontán kereszteződéséből alakulhatott ki.

A szőke mangalica kialakulását követően, a fecskehasú mangalica a szőke és fekete mangalicák, a vörös mangalica pedig a szőke mangalica és a szalontai sertés keresztezéséből jött létre (EGERSZEGI et al. 2003a, ZSOLNAI et al. 2013). A legújabb genetikai vizsgálatok bebizonyították, hogy a mangalica sertések három színváltozata külön fajtát alkot ZSOLNAI et al. (2006), valamint valószínűsítették a fajta Kárpát-medencében való kialakulásának tényét MARINCS et al. (2013).

3.1.2 A mangalica fajták jellemzése

Fajtatiszta mangalicának tekinthetők azok az egyedek, amelyek a korabeli részletes fajtaleírás és törzskönyvi nyilvántartás alapján magukon hordozzák a fajta jellegzetes küllemi jegyeit. Magyarországon jelenleg fajtatiszta állományban csak a szőke, vörös, és fecskehasú mangalica létezik. Kisebbségi fekete mangalica populációk élnek Romániában, az egyéb korábban létezett mangalica színváltozatok pedig, mint amilyen az ordas, baris és vadas, már csak keresztezett állományokban fordulnak elő, vagy kihaltak RADNÓCZI (2006).

Szőke mangalica

A legnagyobb számban előforduló színváltozat (1.a ábra). Testméretét tekintve közepes, szilárd testfelépítésű sertés. Szőrzete dús, gyaluforgácszerűen göndörödő, amelynek színe a szürkétől a sárgászöld árnyalatig terjed. Téli szőrváltás jellemző, ilyenkor vastag, tömött, göndör

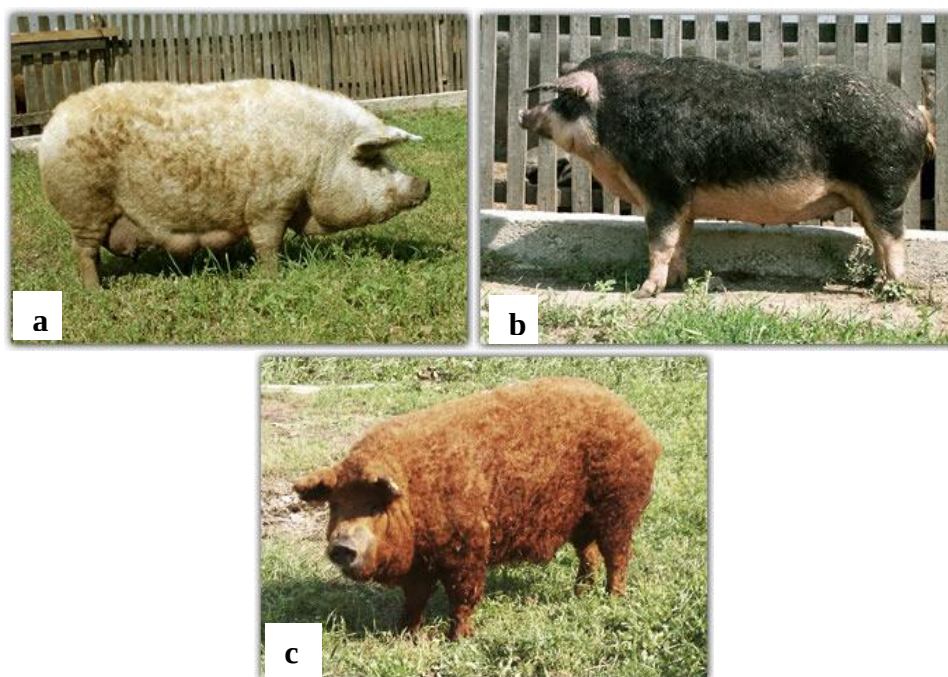
bundát növeszt, még a nyári hónapokra a simább, egyenes lefutású szőrzet a jellemző. A durva szőrzet és a háton felálló sörték nem kívánatos, durvaságra utaló jelek. A fej közepesen hosszú enyhén tört orrháttal, a szemek sötétbarnák, a pillák és a szemöldök színe fekete. A testnyílásokra, a csülökre és a túrókarimára szintén a fekete szín a kívánatos tulajdonság. Bármilyen jól elhatárolható rózsaszín felület a testen vagy a csülkök viaszsárga színe idegen fajtával történt keveredésre utal (RÁCZ 1930, RÁCZ 1932, RADNÓCZI 2006).

Fecskehasú mangalica

A dél-magyarországi területeken alakult ki a szőke mangalica és a fekete mangalica keresztezéséből. Szőrzete az oldalán, a hát felső részén és a végtagokon fekete, míg a has és a toka fehér vagy sárgásfehér színű (1.b ábra). A fajtára jellemző a jó szervezeti szilárdság, a durvább szőrzet. A fecskehasú mangalica testtömeg-gyarapodási és vágási tulajdonságai elmaradnak a szőke mangalicáétól. A fajtára vonatkozó nem kívánatos bélyegek megegyeznek a szőke mangalicánál leírtakkal (RÁCZ 1930, RÁCZ 1932, RADNÓCZI 2006).

Vörös mangalica

A szalontai sertés és a szőke mangalica keresztezéséből származik. Hagyományosan az erdélyi és kelet-alföldi területeken tartották. Színe a barnásvörös különböző árnyalatai lehetnek (1.c ábra). Termete nagyobb, mint a másik két fajtáé, növekedési erélye és szaporasága is jobb (RÁCZ 1932, RADNÓCZI 2006).



1. ábra: Szőke mangalica (a) és fecskehasú mangalica (b) és vörös mangalica (c) (HTTP1)

3.1.3 A mangalica magyarországi helyzete

Az 1860-as évekre a szőke mangalica az ország egész területén uralkodóvá vált, fokozatosan kiszorítva a primitív fajtákat. A XIX. században az ország területén számos sertéshizlaldát (például: kőbányai, szegedi, debreceni) létesítettek, amelyek ki tudták elégíteni a növekvő számú lakosság zsír iránti keresletét, mivel a zsírnak abban a korban fontos étkezési és tartósító szerepe volt a hűtőszekrény és a növényi olajokból készült termékek hiánya miatt (RADNÓCZI 2006, TÖRÖK 2011).

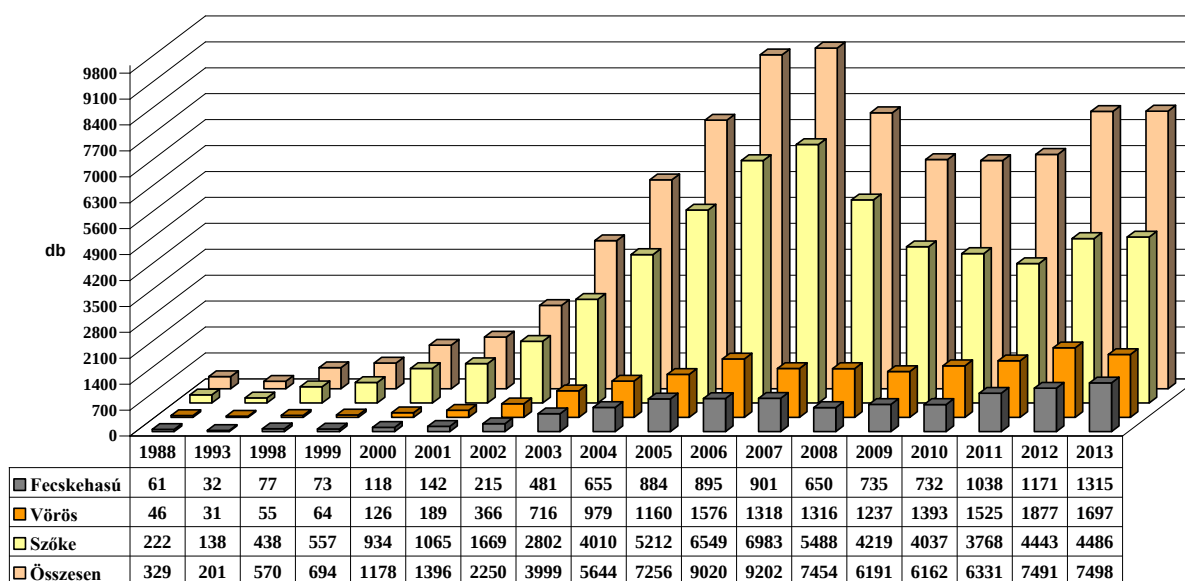
Az állományt először 1895-ben behurcolt kórokozó okozta sertéspestis járvány tizedelte meg, amely után csak lassan indult meg a növekedés. Újabb csapást az I. Világháború és a trianoni békeszerződés jelentette, amelyek következtében a sertésállományunk a harmadára esett vissza TÖRÖK (2011).

1927-ben megalakult a Mangalicatenyésztők Országos Egyesülete és ezzel megkezdődött a mangalicák törzskönyvezése és központilag irányított tenyésztése az állomány növelése céljából. A gazdák nemesítő munkája azonban sok esetben a modernebb fajták (yorkshire, berkshire, német nemes stb.) felé fordult RÁ CZ (1932).

A II. Világháborút követően a mangalica jelentősége tovább csökkent, hiszen a megváltozott étkezési szokások megkövetelték az intenzív tartást bíró, modern, nagy termelőképességű fajták kialakulását. A legnagyobb visszaesés 1960-ban kezdődött, amikor az állomány létszáma 1000 darab alá esett és a 1970-es évekre szinte teljesen eltűnik (EGERSZEGI et al. 2003a, TÖRÖK 2011).

1973-ben az állam védett fajtává nyilvánította a mangalicát. Az 1994-ben újra megalakul Mangalicatenyésztők Országos Egyesületének köszönhetően az eredeti 56 vonalból fennmaradt 27 vonal segítségével jelentős növekedésnek indult a mangalica sertések száma, amiben a génmegőrzési program, az árutermelésbe való bevonás és a falusi turizmus is nagy szerepet játszott (CSAPÓ et al. 1999, TÖRÖK 2011).

Mindezek hatására a kocalétszám ugrásszerűen megnövekedett, 2007-ben pedig a nyilvántartott kocák száma már elérte az azóta is csúcst jelentő 9202 egyedet. A Mangalicatenyésztők Országos Egyesületének (MOE) nyilvántartásában 2013-ben 7498 fajtatiszta mangalica koca szerepelt (TÓTH 2009, HTTP2). A 2. ábrán látható a kocák számának változása 1988-tól 2013-ig.



2. ábra: A mangalica kocalétszám alakulása 1988 és 2013 között MOE adatok alapján

3.1.4 A mangalica értékmérő tulajdonságai és gazdasági jelentősége

A mangalica tipikus zsírsertés, színhús kihozatala 30-40%-os, amelyhez lassú növekedés párosul. Ideális vágási súlyát közel két és fél év alatt éri el szemben a 230-240 nap között vágható modern fajtákkal, amelyeknél a színhús arány is kedvezőbb (ENDER 2002, RADNÓCZI 2002, HOLLÓ et al. 2003, NISTOR et al. 2012). A mangalica alomszáma és a takarmányértékesítő képessége is elmarad a modern fajtáktól (1. táblázat).

1. táblázat: A mangalica és a húsertés összehasonlítása különböző értékmérők alapján

Mangalica		Húsertés
5-6	Alomszám (db)	10-12
13	Nevelési idő (hónap)	6
130-160	Vágási súly (kg)	90-110
40-59	Szalonnvastagság (mm)	18-20
28	Izomvastagság (mm)	46
37	Színhús (%)	52
420-460	Gyarapodás (g/nap)	530-560
4,6-5,2	Takarmányértékesítés (kg/kg)	2,8-3,9

TÖRÖK 2011 nyomán

A mangalica húsa nagy mennyiségű intramuszkuláris zsírt tartalmaz, így ízletesebb, elkészítve pedig porhanyósabb mint a húsertés fajtáké (FLEGER 1999, CSAPÓ et al. 1999, MICKLICH et al. 1999, HALMY 2006). Szalonnája a kedvező zsírosszetételnek köszönhetően kiválóan hasznosítható magas zsírtartalmú termékek gyártására HOLLÓ et al. (2003).

A modern fajtákkal történő összehasonlító vizsgálatokból kitűnik, hogy azonos takarmányozási körülmények mellett a mangalica húsa több mikroelemet és B vitamint tartalmaz, amely a takarmány összetételétől függetlenül, genetikailag meghatározott. Hústermelési intenzitása rövid ideig tart, fokozott zsírbeépülés mellett. Ugyanakkor izomszövetei a zsírtartalomhoz hasonlóan magas szárazanyag-tartalommal rendelkeznek (RADNÓCZI 2002, LUGASI 2006, TÓTH et al. 2009).

A takarmányozás mangalica esetében is befolyásolja a szövetek zsírosszetételét, pl. a hátszalonna több telítetlen zsírsavat tartalmaz, mint egyéb testtájak zsírszövetei, azonban telített zsírsavak arányában nem tér el a hústípusú sertésektől (RADNÓCZI 2002, NISTOR et al. 2012). Takarmányozással jelentősen befolyásolható az omega 3 és omega 6 zsírsavak aránya, amely így is meghaladja a humán táplálkozásban javasoltat.

Az egészséges táplálkozásnál, a hús koleszterin-tartalma is fontos szempont. A mangalica húsa alapvetően nem tartalmaz kevesebb koleszterint, de annak szintje extenzív tartással csökkenthető (HALMY 2006, SZABÓ 2006).

A megfelelő technológiákkal, mint amilyen a fajta sajátosságainak megfelelő takarmányozás és tartás, javítható a sertéshús minősége LUGASI (2006).

A mangalica húsának kedvező beltartalmi értékei miatt a belőle készült termékek iránt az 1990-es évektől egyre nőtt a piaci kereslet, és ezzel együtt az állatállomány is növekedésnek indult. A piaci versenyképesség növelése érdekében a MOE engedélyezte az árutermelésre szánt mangalica×duroc hibridek előállítását.

Ez azonban szigorú szabályozás alatt áll:

- a mangalica koca és duroc kantól származó F1 nemzedék kizárólag árutermelésre állítható elő;
- a mangalica eredetére és a mangalica vérhányadra vonatkozó igazolással kell rendelkezni, aminek a kiadását a 86/2007(VIII.17) FVM EÜM.-SZMM. az élelmiszer jelölésről szóló rendelet szabályozza (http3, SZABÓ 2000);
- az árutermelés nem veszélyeztetheti a fajtatiszta állományt

A mangalica sikerességét részben annak is köszönheti, hogy hátsó combja ideális hosszú ideig érlelt sonka elkészítéséhez. Jelenleg az Olmos és Tóth Kft. koordinálja az exportot, valamint a

vállalat a saját telepe biztosítja a tenyésztés-, és a vágóállatok utánpótlását és szerepet vállal a génmegőrzésben is. Napjainkban Spanyolország mellett több kontinensre is szállítunk (TÓTH 2006, TÖRÖK 2011).

A szigorú szabályozás ellenére előfordulnak ellenőrizetlen tenyészetek ahonnan az élelmiszerláncba nem megfelelően jelölt mangalica termékek jutnak.

A kereskedelemben felmerülő problémák ellenére a mangalica a jövedelmezősége és fenntarthatósága („saving by consumption”) megvalósulni látszik, ami a fajta megőrzése szempontjából különösen fontos POPOVICS et al. (2011).

3.2 Genom programok

A Humán Genom Program után az újgenerációs szekvenálási módszerek elterjedésével számos modellállat és gazdaságilag jelentős állatfaj teljes genomját is megismerték a kutatók. A sertés 18 testi valamint X és Y ivari kromoszómákat tartalmazó genomjának mérete 2,8 Gb körüli, ami hasonló az emberéhez. A sertés a világ fontos élelmiszerforrása és mivel az élettani és biokémiai tulajdonságai közel állnak az emberhez, az emberi betegségek modellezésében is használható (GROENEN et al. 2012, HTTP4).

3.2.1 Nemzetközi sertés genom projektek

A „Sino-Danish Pig Genome Project” 2005-ben számolt be először sertés genomról 0,66-szoros lefedettséggel WERNERSSON et al. (2005).

A 2003-ban alakult Sertés Genomszekvenálási Konzorcium (Swine Genome Sequencing Consortium), amelynek tagjai között 12 ország számos kutatóintézete és egyeteme található meg, 2009 novemberében tette elérhetővé az Ensembl adatbázisban a sertés teljes referencia genom szekvenciáját (SCHOOK 2005, UENISHI et al. 2009, ARCHIBALD et al. 2010, HTTP5). A SGSC amellet, hogy fényt derített a sertés evolúciójára és a házasításának körülményeire, tovább bővítette és pontosította a szekvenciákat, így 2012 novemberében számos európai és ázsiai, vad és házasított sertés genomszekvenciáival frissülhetett a referencia adatbázis GROENEN et al. (2012).

Ugyanebben az évben hozták nyilvánosságra az 1987 óta beltenyésztéssel kialakított Wuzhishan mini-sertés teljes genomjának szekvenciáját és annak elemzését FANG et. al (2012). A rendelkezésre álló adatok lehetőséget biztosítanak a komplex genetikai betegségek, mint amilyen az elhízás, szív-és érrendszeri betegségek, endokrinológiai megbetegedések, alkoholizmus, nefropátia,,

cukorbetegség, Parkinson-, és Alzheimer-kór, modellezésére a humán gyógyászatban (ARCHIBALD et al. 2010, FANG et al. 2012, WALTERS et al. 2012).

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a különböző sertésfajták genomszekvenciái elősegítik a sertések hatékonyabb felhasználását a mezőgazdasági termelésben és értékes információkkal szolgálnak a humán orvostudomány számára EDMUNDS (2012).

3.2.2 Hazai sertés genom projektek

Magyarországon az első haszonállat genomprogramot a MANGFOOD konzorcium hívta életre a mangalica fajtákra, amelyek esetében korábban szaporodásbiológiai és élettani funkciókkal kapcsolatos kutatások voltak jellemzőek (CSAPÓ et al. 1999, ENDER 2002, HOLLÓ et al. 2003, EGERSEGI et al. 2003b, RÁTKY 2005).

MANGFOOD projekt

A Nemzeti Fejlesztési Ügynökség támogatásával hat részvevő (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, Központi Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet, Biomi Kft., Wessling Magyarország Kft., Olmos és Tóth Kft.) közreműködésével indult el 2009-ban a program, amely célul tűzte ki a mangalicából készülő húskészítmények versenyképességének növelését, azok nyomon követhetőségét, az esetleges hamisítványok kiszűrését a piacról és a mangalica fajta tisztavérű tenyészetben történő fenntartásának elősegítését, korszerű biokémiai és genomikai módszerek segítségével (HTT6, MOLNÁR et al. 2014).

A kutatások kezdetén létrehoztak egy központi biobankot, amely az összes magyarországi mangalica apai vonalból és anyai családból származó szövetmintákat tartalmazza. A tenyésztési adatok alapján egy-egy szőke, vörös és fecskehasú mangalica valamint egy duroc egyedet választottak ki, amelyeknek teljes genomját meghatározták az akkor elérhető újgenerációs szekvenáló (NGS) módszerekkel (Roche 454 Titanium FLX, ABI SOLiD és Illumina HiSeq 2000) MOHR (2011). A szekvenálás eredményeként a szőke mangalica esetében 19-szeres, a fecskehasú mangalica esetén 14-szeres, vörös mangalica esetén szintén 14-szeres átlagos lefedettséget kaptak. Ezzel sikerült a nemzetközi genom adatbázist is bővíteni, mivel a mangalica nem szerepelt a vizsgálandó fajták listájában.

A genomikai adatok feldolgozásával olyan strukturális variációkat (inszerciákat, deléciákat és SNP-eket), azonosítottak, melyek segítségével nagy biztonsággal megállapítható a bolti termékek eredete és a mangalica fajtaazonosítása (MOLNÁR et al. 2014, ZSOLNAI et al. 2013, HTT6).

Mitokondriális DNS D-loop régiójának vizsgálatával 27 haplotípusba tudták sorolni a magyarországi mangalica állományt, ami jól elkülönül a többi sertésfajtától (MOLNÁR et al. 2012, MARINCS et al. 2013).

3.3 Szekvenálási módszerek

3.3.1 Első generációs szekvenálás

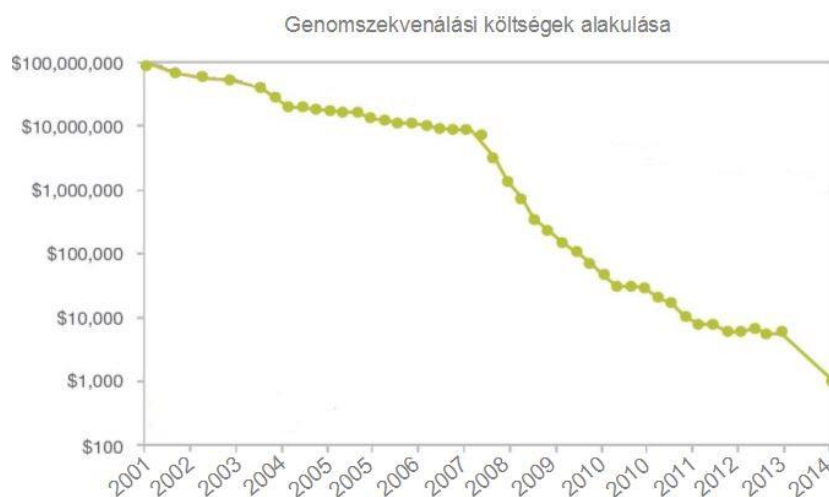
Elsőként Frederick Sanger, Alan Coulsonnal kidolgozta a plusz és mínusz technikát, amely a hagyományos kémiai módszereken alapult. Ennek segítségével sikerült meghatározni a teljes genomját a phi X174 bakteriofágnak (SANGER & COULSON 1975, SANGER et al. 1977).

1977-ben a Sanger-féle láncterminációs szekvenálási eljárás forradalmasította a DNS bázissorrendjének meghatározását. A munkájáért Sanger 1980-ban megosztott Kémiai Nobel Díjat kapott SANGER et al. (1977). Ez az eljárás pontos ugyan de lassú, ezért ma már automata kapilláris elektroforézises szekvenáló berendezést használnak (DOVICH 2000, WEAVER & HEDRICK 2000). Napjainkban is kedvelt kisebb DNS szakaszok meghatározására pontossága révén.

3.3.2 Új generációs szekvenálási módszerek

A Humán Genom Program (HGP) befejezésével, amint szinte kizárólag a automatizált kapilláris elektroforézissel végeztek, megnőtt a különböző élőlények genomjának megismerésének igénye. Azonban új platformok fejlesztésére volt szükség, mivel a korábbi módszerek lassúak és költségesek voltak MARDIS (2008, 2011). Az ezredfordulót követően megjelentek az új generációs szekvenáló rendszerek, amelyek képesek voltak egyszerre több DNS szakasz párhuzamos meghatározására. Az NGS-k lehetőséget biztosítanak kópiaszám variációk, indelek, SNP-k azonosítása mellett biológiai és ökológiai kutatásokban elvégzésére is MIHÁLY & GYÖRFFY (2011).

Az NGS rendszerek 2004-ben kezdtek a kereskedelmi forgalomban megjelenni és fejlődésükkel egyre olcsóbbá váltak (3.ábra) a teljes körű genom vizsgálatok indítása MARDIS (2011).



3. ábra: A genomszekvenálási költségek alakulása 2001-2014-ig (http4)

A rendelkezésre álló platformok közül hazánkban még mindig a Roche/454 FLX, Applied Biosystems SOLiD™4, Illumina HiSeq2000 a legismertebb.

A Roche/454 Titanium FLX szekvenátor volt az első amelyet kereskedelmi forgalomba hoztak. A készülék a szekvenálás szintézissel (sequencing by syntesis) módszert alkalmazza, amelynek az a lényege, hogy az egyszálúsított DNS szakaszt egy gyöngyhez kötik, és emulziós PCR reakció segítségével amplifikálják. Ezt követően a gyöngyöket egyesével egy picotiter plate-re helyezik, és piroszekvenálással meghatározzák a szekvenciákat. A készülék előnye, hogy hosszú a bázis leolvasási teljesítménye (400bp) és egy 10 órányi futás alkalmával átlagosan 500 Mb teljesítményre képes. Ez a hosszú bázis leolvasás megkönnyíti a de novo genomillesztést, azonban a rendszernek gondot jelentenek az ismétlődő szekvenciák, deléciók, inszerciók felismerése. A legújabb készülékek (GS FLX+, GS Junior) már 1 millió bázis leolvasási teljesítményre képesek (VOELKERDING et al. 2009, MARDIS 2011, MIHÁLY & GYÖRFFY 2011, HUI 2012, SHOKRALLA et al. 2012, HTTP7).

Az ABI SOLiD-nál, hasonlóan a Roche 454 FLX-hez emulziós PCR-rel sokszorosítják fel a DNS fragmentumokat, azonban ebben az esetben a szekvenálás ligálással történik. A tárgylemezhez kötött gyöngyöket négyféle fluoreszcens jelölést tartalmazó próbákkal hibridizálják. A próbák első két nukleotidja ismert, így a floureszcens jel színkódjai alapján határozzák meg a szekvenciákat. Rövid 2x50 bázis leolvadásra képes és a teljes futási idő alatt 4 Gb nyers szekvenciaadat keletkezik (VOELKERING et al. 2009, MARDIS 2011, MIHÁLY & GYÖRFFY 2011, SHOKRALLA et al. 2012, HTTP7).

2007-ben jelent meg az Illumina HiSeq 2000, amelyet a Solexa cég fejlesztett ki, amit az Illumina felvásárolt. A meghatározni kívánt DNS szakaszok felsokszorosítására ún.

hídamplifikációt alkalmaznak. Az amplifikációt követően eltávolítják a reverz szálakat és fluoreszcensen jelölt nukleotidokat adnak a templát szálhoz. A bázisbeépüléskor keletkező jel alapján határozzák meg a szekvenciasorrendet (VOELKERING et al. 2009, MARDIS 2011, MIHÁLY & GYÖRFFY 2011, SHOKRALLA et al. 2012, HTTP7). Teljes bázis leolvasási kapacitása két és fél nap alatt 1,5 Gb, így az Illumina HiSeq2000 7-10 nap alatt képes egy emberi genom szekvenálására, mindezt alacsony költségek mellett. Az Illumina cég további platformokat fejlesztett ki, amelyek közül az idei évben megjelent HiSeq X Ten készülék egy teljes humán genom szekvenálási költséget 1000 \$-ra csökkenti (HAYDEN 2014, http8).

3.4 Molekuláris markerek

Molekuláris markerként használhatók a DNS olyan meghatározott szakaszai, melyek specifikus szekvenciákat tartalmaznak, és követik a mendeli öröklésmenetet. Lehetnek gének, vagy olyan DNS szakaszok egyaránt, amelyeknek nincs fenotípust kialakító szerepe HESZKY (2005). Az ideális DNS markerek nagyfokú polimorfizmussal rendelkeznek, lehetőleg kodominánsan öröklődnek, gyakori az előfordulásuk, és reprodukálható eredményt adnak TENEVA (2009). A molekuláris markerek főbb alkalmazási területe a genotípus-azonosítás, genotipizálás, nemesítési vonalak és fajták homogenitásának ellenőrzése, genetikai diverzitás elemzése, génváltozatok és allélvariációk azonosítása, természetes populációk jellemzése TENEVA et al. (2013).

Genetikailag a házi sertés az egyik legvariábilisabb haszonállat így esetében számos molekuláris (pl. RAPD, RFLP, AFLP, mikroszatellit és SNP) marker használható különböző genetikai vizsgálatokhoz (CARATTI et al. 2010, OLLIVER & FOULLEY 2011, YANG et al. 2013, MOLNÁR et al. 2014)

RFLP markerek segítségével a restrikciós mintázat alapján a közeli rokon fajokat lehet elkülöníteni egymástól. Manapság például a halotán teszt helyett PCR-RFLP-t alkalmaz a stresszérzékeny homozigóta recesszív genotípusú sertések azonosítására BĂCILĂ et al. (2011). RFLP segítségével a leptin génben négy új genetikai polimorfizmust azonosítottak különböző sertésfajtákban (JIANG & GIBSON 1999, YANG et al. 2013). A technika előnye megbízhatósága, ismételhetősége és az RFLP markerek kodomináns öröklődése. Hátránya, hogy nagyon munka és időidényes, az RFLP markerek polimorfizmusa viszonylag alacsony fokú, és emellett szükséges a szekvencia ismerete is (TENEVA 2009, YANG et al. 2013).

A RAPD módszerrel ismeretlen DNS szekvenciákat lehet amplifikálni rövid (10bp hosszú), random szekvenciájú primerekkel. RAPD-dal meghatározható a különböző fajok genetikai

diverzitása, így például a vaddisznó és a sertés specifikus genetikai ujjlenyomatát is meghatározták már ezzel a technikával KOH et al. (1998). A módszer ugyan egyszerű, gyors és olcsó, de a RAPD markerek domináns öröklődésűek és a módszer megbízhatósága, reprodukálhatósága is kifogásolható YANG et al. (2013).

Az AFLP technikával, hasonlóan a PCR-RFLP-hez, nagy mennyiségű restrikciós fragmentumot lehet PCR segítségével detektálni. Nagy előnye az RFLP-vel szemben, hogy nem szükséges hozzá szekvencia ismerete. Az AFLP-vel generált „DNS-ujjlenyomat”-ok jól használhatóak géntérképezésre, és a populációk beltenyésztettségének felmérésére. Hátránya, hogy dominánsan öröklődik, így a heterozigóta egyedet nem lehet csupán a mintázat alapján kiszűrni (VOS et al. 1995, OVILO et al. 2000, YANG et al. 2013).

A mikroszatelliteken alapuló molekuláris markereket az 1990-es évektől használják egyed- és fajtaazonosításra valamint genetikai összehasonlítások elvégzésére (OVILO et al. 2000, ROMANOV & WEIGEND 2001, CARATTI et al. 2010, YANG et al. 2013, MELÉNDEZ 2014). Jól alkalmazhatók filogenetikai ellenőrzésre, betegséget okozó genetikai rendellenességek keresésére, QTL térképezésre és MAS-ra (ERHARDT & WEIMANN 2007, TENEVA et al. 2013, YANG et al. 2013). Ezek a rövid repetitív szekvenciák viszonylag egyenletesen oszlanak el a genomban, de használatuknál fontos a szekvencia ismerete, az adott lókuszra specifikus primerek tervezéséhez. Mindezek ellenére a mikroszatellitekkel történő genetikai vizsgálat hatékonyabb a fentebb leírt más módszereknél, hiszen automatizálható, nagy pontosságú, magas reprodukálhatóságú, multiplexelhető és a mikrosatellit markerek kodominánsan öröklődnek (YANG et al. 2013, MELÉNDEZ 2014).

Az SNP-nek nevezzük a pontmutációkat, amiket csak akkor tekintünk variációnak ha a populáció legalább 1%-ában megjelennek VIGNAL et al. (2002). Az SNP-k nagy mennyiségben jelennek meg a genom kódoló és nem kódoló régiójában is. Kedvelt molekuláris markerek a különböző haszonállatok genetikai betegségének vizsgálatában, mivel nagy számban történő előfordulásuk és nagyfokú variabilitásuk miatt különösen alkalmasak genetikai rokonságok felderítésére (WILKINSON et al. 2012, ZSOLNAI et al. 2013). Ezenkívül fontos szerepet játszanak a haszonállatok evolúciós eredetének kutatásában, és a populációk közötti filogenetikai rokonság feltárásában MARINCS et al. (2013). A genomszekvenálási módszerek alkalmazása ugrásszerűen megnöveli a lehetséges SNP markerek azonosítását, ami különös jelentőségű például populációk genetikai variációinak megismerésében YANG et al. (2013).

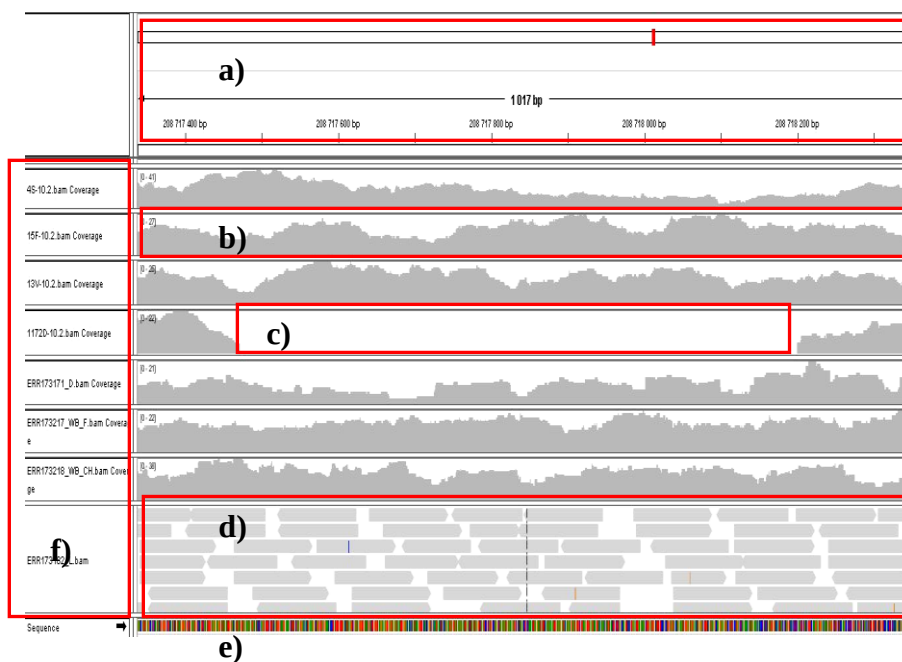
A strukturális variációk (SV) közé tartozik a hosszabb DNS szakaszok kiesése vagy beépülése (deléció, inszerció, vagy összefoglaló néven indel) miatti különbségek, valamint a kromoszómán belüli kópiaszám variációk (CNV) ZHANG et al. (2011). Ezeknek a szerkezeti változásoknak,

amelyek szerepet játszanak a fenotípus és a genetikai variáció kialakításában OGURTSOV et al. (2004), megismeréséhez a teljes genomok ismeretére volt szükség. Amennyiben a CNV-k és indelek exonokat érintenek, akkor gének és betegségek megismerésére is alkalmasak (YALCIN et al. 2012, ZICHNER et al. 2013). A sertés esetén MOLNÁR és munkatársai (2014) a mangalica fajták és a duroc genomjának összehasonlításával több millió SNP-t és SV-t detektáltak.

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Bioinformatika

Csoportunkban a mangalica genomok MOLNÁR et al. (2014) és egyéb publikált sertés teljes genomok GROENEN et al. (2012) összehasonlításával több száz lehetséges strukturális eltérést határoztak meg. Ezeket a lókuszokat az összes genomszekvenált sertésfajta esetében vizualizáltuk és leellenőriztük az Integrative Genomics Viewer 2.0 (Broad Institute, Amerikai Egyesült Államok) szoftver ROBINSON et al. (2011) segítségével. A program alkalmas nagymennyiségű adat kezelésére, több genom egyidejű vizsgálatára és a felhasználóbarát kezelőfelülete révén a teljes genom bázispár szintű elemzésére. Ezenkívül a program segítségével a szekvenciákhoz tartozó lefedettségi adatok is megjeleníthetők, így hasznos információk nyerhetők a szekvencia minőségéről is ROBINSON et al. (2011). Az IGV felhasználói felületének fontosabb elemei a 6. ábrán láthatók.



6. ábra: Az IGV felhasználói felülete

a) a vizsgált genomszakasz pozícióját és méretét mutatja; b) a genomszekvenciára vonatkozó lefedettséget mutatja; c) adott szakaszon hiányzó szekvencia (delécio); d) rövid szekvenciadarabokat (readeket) jelölő sávok; e) a referencia genom szekvenciáit mutatja a megfelelő nagyításban; f) a vizsgált genomok azonosítóit mutatja

Azokat a szekvenciákat, amelyek a vizualizálás alapján alkalmasnak mutatkoztak sertésfajták elkülönítésére, az Ensembl (<http://www.ensembl.org>) adatbázisból letöltöttem, és az repetitív szakaszokat „soft mask” opció segítségével kiszűrtem. A várhatóan diagnosztikai különbségeket mutató régiókra PCR primereket terveztem a Primer3 (GNU General Public License version 2.0, <http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) szoftverrel. A tervezett primereket UCSC In-Silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>) programmal ellenőriztem le.

4.2 Biobanki minták

A kutatás alapját a MANGFOOD konzorcium által létrehozott, körülbelül 1600 mezőgazdasági haszonállat és vadfaj egyedeinek szövet-, vér-, szőr-, sperma mintájából álló gyűjtemény adta. A biobankban található 908 sertés minta közül 224 db szőke, 102 db fecskehasú 72 db pedig vörös mangalica egyedből származik, amivel a gyűjtemény az összes mangalica család és vonal genetikai állományát lefedi. A többi sertés minta főbb világfajtákból származik, hasonló nagyságrendben. A sertésen kívül számos más fajból illetve fajtából (gímszarvas, sárga magyar tyúk, magyar bronzpulyka, magyar kacska, fodros tollú lúd, fekete racka, gyimesi racka) és bolti hústermékekből származó minta szolgál különböző vizsgálatok elvégzésére.

4.3 DNS izolálás

Vizsgálataimhoz 231 sertés és 6 más fajba tartozó egyed mintáit választottam ki (2. táblázat). A kiválasztott egyedek vér, szövet vagy sperma mintáiból a Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, Taiwan) illetve a QIAamp DNA Investigator Kit (QIAGEN, Németország) segítségével izoláltam DNS-t, a gyártók utasításai szerint. Az izolált DNS-ek mennyiségét és tisztaságát spektrofotometriás eljárással, Nanodrop ND-1000 (NanoDrop, Amerikai Egyesült Államok) készülék segítségével ellenőriztem.

A minőségi ellenőrzés alapján a minták koncentrációja átlagosan 103,92 ng/μl volt (27,9 ng/μl - 809 ng/μl), és a tisztaságuk is a PCR reakciókhoz elvárható 1,6-1,9 (260/280 nm-n mért abszorpciós arány) határértékek között mozgott. A DNS mintákat a további vizsgálatokhoz 15 ng/μl koncentrációra hígítottam és -20°C-on tároltam.

2. táblázat: A vizsgálat során az általam felhasznált minták számszerű eloszlása

Sertésfajták									Σ
Szőke mangalica	Fecskehasú mangalica	Vörös mangalica	Duroc	Pietrain	Hampshire	Lapály	Nagy fehér	Vaddisznó	
24	24	24	35	12	12	12	12	16	171

Sertés hibridek			Egyéb fajok						Σ
Mangalica × duroc	H39 × nagy fehér	Nagy fehér × lapály	Ló	Tyúk	Lúd	Pulyka	Kacsa	Gímszarvas	
12	36	12	1	1	1	1	1	1	66

4.4 PCR reakciók és az adatok kiértékelése

A reakciókat 60 ng DNS templát felhasználásával végeztem, 0,2 mM-os primer, 0,2 mM-os dNTP és 2 mM-os MgCl₂ végkoncentráció mellett, 0,5 U Immolase (Bioline, Egyesült Királyság) DNS polimeráz enzim felhasználásával (3. táblázat).

3. táblázat: A PCR reakciónál használt összetevők mennyisége 1 reakcióra számolva

PCR reakció	Koncentráció	Bemért mennyiség	Végkoncentráció
Templát	15 ng/μl	4μl	60 ng
Primer 1	10 mM	0,5μl	0,2 mM
Primer 2	10 mM	0,5μl	0,2 mM
Primer 3	10 mM	0,5μl	0,2 mM
dNTP	2,5 mM	2μl	0,2 mM
MgCl ₂	50 mM	1μl	2 mM
10x Immo Buffer		2,5μl	1x
Immolase	5 U	0,1μl	0,5 U
Desztillált víz		13,9μl	
Végtérfogató		25μl	

A PCR reakciókat az alábbi PCR programmal végeztem:

Kezdeti denaturáció	95°C	10 perc	1x
Denaturáció	94°C	40 másodperc	
Annealing	60°C	40 másodperc	40x
Extension	72°C	1 perc 10 másodperc	
Végső extension	72°C	5 perc	1x

A PCR termékeket gélelektroforézissel választottam el, amely a DNS molekulák méret szerinti elválasztását teszi lehetővé agaróz gélben LEE et al. (2012). Ehhez etídium-bromidot (EtBr) tartalmazó, 1,2%-os, 1x töménységű TBE pufferrel készített agaróz gél használtam. Az EtBr a leggyakrabban használt reagens, amely beépül a DNS két szála közé és ultraibolya fényben történő fluoreszcenciával láthatóvá teszi az agaróz gélben elválasztott különböző méretű fragmenteket. A fény intenzitásából a DNS mennyiségét is meg lehet becsülni LEE et al. (2012). A PCR reakciókban kapott DNS-fragmentumok méretének meghatározására 4µl GeneDirex 100bp DNA Ladder RTU (GeneDirex, Egyesült Királyság) és GeneDirex 1kb DNA Ladder RTU (GeneDirex, Egyesült Királyság) molekulasúly markert futtattam a PCR reakciókkal együtt. A gélelektroforézis folyamatának nyomon követésére 5µl reakcióhoz 1µl 6x töménységű jelzőfestéket adtam és a fragmentek elválasztását 4V/cm-es feszültséggel, 90 percig végeztem. Az eredményekről ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, Amerikai Egyesült Államok) készülékkel képet készítettem a kiértékeléshez.

A agaróz gélekről készült fotók alapján meghatároztam az egyes egyedek genotípusát, az adatokat Excel táblázatban rögzítettem és belőlük allélgyakoriságot számoltam.

Az allélgyakoriságok alapján a fajtaazonosítást az INRA által fejlesztett GeneClass2 program PIRTY et al. (2004) segítségével végeztem. Ez a szoftver képes egyedeket és csoportokat egy adott referencia populációhoz hozzárendelni és/vagy abból kizárni a megadott besorolási kritériumok alapján.

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 Bioinformatika

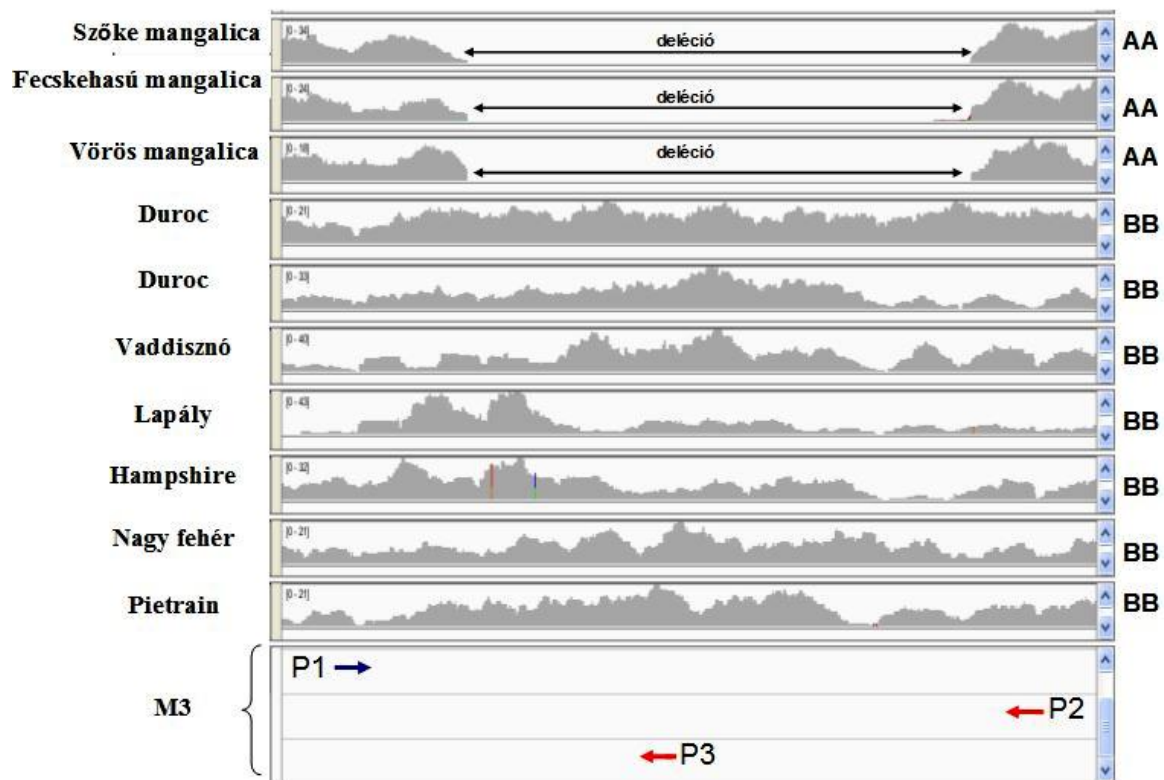
A csoportunkban korábban meghatározott több száz, sertés genomok közötti lehetséges strukturális különbségből 25 pozíciót vizualizáltam és ellenőriztem az IGV szoftver segítségével. Ezen pozíciók közül 8 olyan szakaszt találtam, amely a rendelkezésre álló sertés genomszekvenciák alapján fajtaspecifikusnak tűnő különbséget mutatott. Ezeket vizsgáltam tovább PCR segítségével.

Először előszűrést végeztem egy duroc sertés egyeden, három mangalica egyeden (szőke, vörös, fecskehasú) és 8 sertésfajta 12-12 egyedét magába foglaló kevert mintáján (mangalica, duroc, H39 × NF, nagy fehér, vaddisznó). A vizsgált 8 szakasz közül hétnél kaptam PCR terméket, de hatnak az esetében nem volt diagnosztikus értékű különbség. A diagnosztikai különbséget mutató marker, amelyet M3-nak neveztem el, mutatkozott alkalmasnak arra, hogy a mangalica fajta elkülönítésre használható legyen (4. táblázat).

4. táblázat: Bioinformatikailag prediktált markerpontok

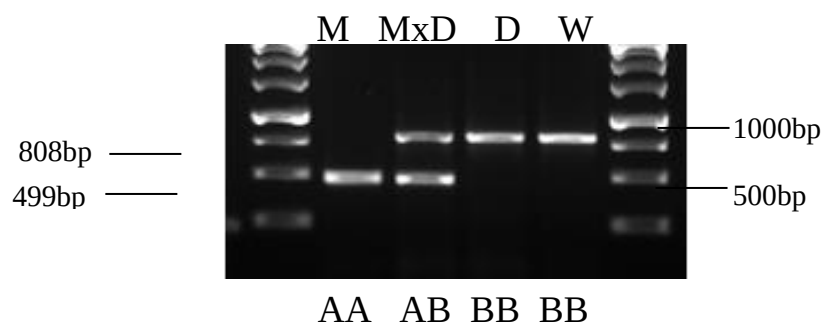
Sorszám	Szekvencia különbség	Primer	PCR előteszt
1	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
2	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
3	Mangalica specifikus	Tervezve	Nem fajtaspecifikus különbség
4	Mangalica specifikus	Tervezve	Nincs termék
5	Mangalica specifikus	Tervezve	Nem fajtaspecifikus különbség
6	Mangalica specifikus	Tervezve	Nem fajtaspecifikus különbség
7	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
8	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
9	Mangalica specifikus	Tervezve	Nem fajtaspecifikus különbség
10	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
11	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
12	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
13	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
14	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
15	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
16	Mangalica specifikus	Tervezve	Nem fajtaspecifikus különbség
17 (M3)	Mangalica specifikus	Tervezve	Fajtaspecifikus különbség
18	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
19	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
20	Mangalica specifikus	Tervezve	Nem fajtaspecifikus különbség
21	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
22	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
23	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
24	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---
25	Nem fajtaspecifikus	Nincs	---

Az M3-as marker genomi pozíciójának IGV programmal történő vizualizációjakor látható (8. ábra), hogy az M3 marker P3 primere egy olyan szakaszra esik, amely a mangalicákban hiányzik. Ennek a deletálódott szakasznak a hossza 1217 bp, ezért a P1 és P2 primerekkel végzett PCR reakció mangalicákban egy rövidebb fragmentet eredményez, míg a P1 és P3 primerekkel végzett reakció csak a nem mangalica fajtákban ad terméket.



8. ábra: Az M3 marker primereinek helyzete az ismert sertésfajták genomján

Az előzetes tesztelést követően, a szekvenciák alapján a mangalicák esetén egy 499bp (A allél), más fajtákban egy 808bp (B allél) hosszúságú fragmentet várhatunk, míg a mangalicák egyéb fajtákkal alkotott hibridjeiben mindkét fragment megjelenik (9. ábra).



9. ábra: Az M3 marker genotípusos megjelenése a géliképen

M= mangalica, MxD= mangalica×duroc hibrid, D= duroc, W= vaddisznó

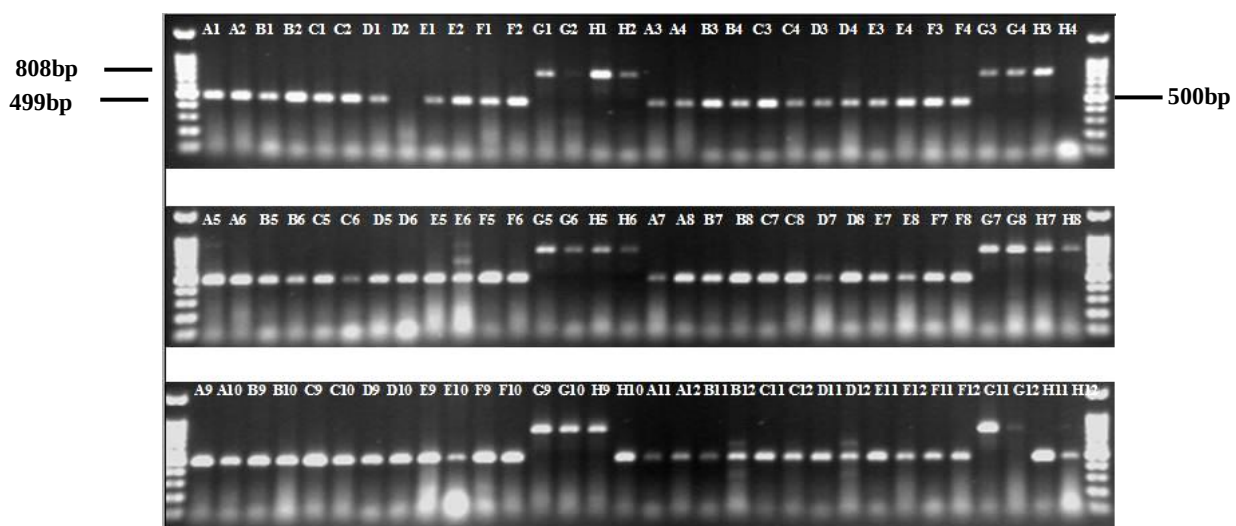
AA= homozigóta, AB= heterozigóta, BB= homozigóta

A továbbiakban az előszűrésen ígéretes eredményeket mutató M3-as markert használtam más sertésfajták és egyedek vizsgálatára. Ehhez, két egyenként 96 egyedet magába foglaló mintasort állítottam össze, ahol az azonos fajtákhoz tartozók egy sorban voltak (I. és II. melléklet). Továbbá 16 vaddisznó-, 12 lapály-, és 14 duroc egyed mintáit tartalmazó mintasort használtam (III. melléklet).

5.2 PCR optimalizálás és az M3 marker tesztelése

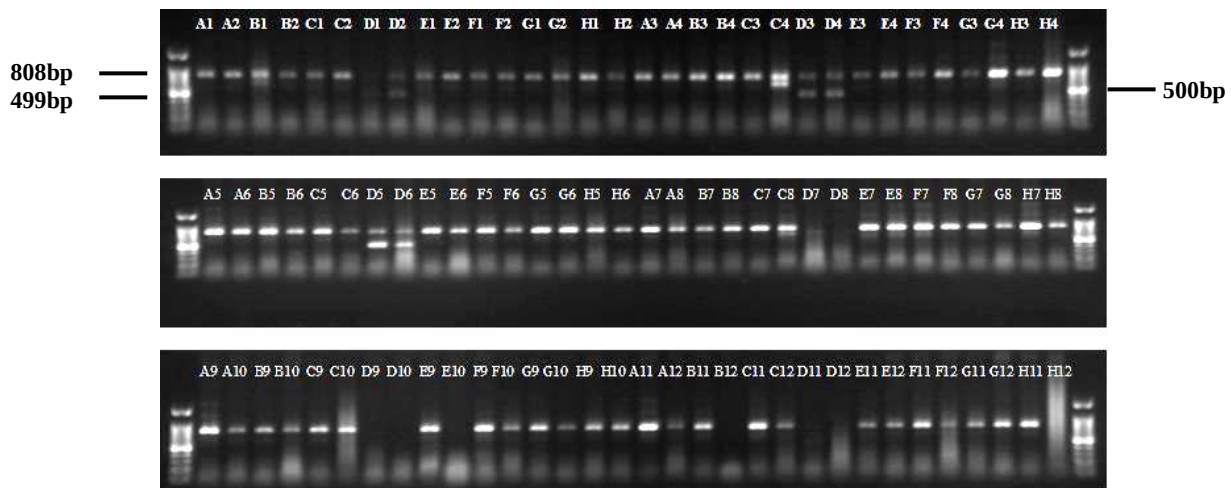
Ezekben a vizsgálatokban az egyedek genotipizálását az M3 marker mindhárom primerét tartalmazó ún. multiplex PCR reakcióval végeztem. A multiplex PCR második lépésének 72 °C-on végzett kiterjesztési idejét úgy állítottam be, hogy mangalicákban csak a P1-P2 primerekkel képződő 499 bp nagyságú fragment, míg a nem mangalica fajtákban csak a P1-P3 primerekkel képződő 808 bp méretű termék jelenjen meg. Összesen 237 (231 sertés és 6 más fajhoz tartozó) egyedet vizsgáltam. A várakozásoknak megfelelően a mangalicákban a 499bp hosszú DNS fragment (A allél), míg más fajtákban a 808bp hosszúságú termék (B allél) jelent meg. Mangalica hibridek esetén mind a hosszabb, mind a rövidebb jel látható, ami szintén összhangban van a várakozásokkal.

A kontrollként használt nem sertés fajokban nem kaptunk a markereink nagyságának megfelelő terméket. A 10-es és 11-es ábrán a két 96-os mintasor elektroforézisének gélképe látható.



10. ábra: Az M3-as marker gélképe (Marker 1kb GeneDirex).

Szőke mangalica (A1-A12); Szőke mangalica kanok (B1-B12); Fecskéhasú mangalica (C1-C12); Fecskéhasú mangalica kanok (D1-D12); Vörös mangalica (E1-E12); Vörös mangalica kanok (F1-F12); Duroc (G1-G12, H1-H9); Szőke mangalica x duroc (F1) (H10-12)



11. ábra: Az M3-as marker gélképe. (Marker 100bp GeneDirex).

Pietrain (A1-A12); Hampshire (B1-B12); Nagy fehér (C1-C12); Mangalica x duroc (F1) (D1-D6); Kontroll fajok (D7-D12); H39 x Nagy fehér (E1-E12), H39 x Nagy fehér (F1-F12); H39 x Nagy fehér (G1-G12); Nagy fehér x lapály (H1-H12)

Az M3-as marker allélikus variációja lehetőséget adott az egyedek genotípusainak meghatározására (4. táblázat). A kapott genotípusokat Excel táblázatban rögzítettem és ez alapján számoltam allélgyakoriságokat (IV. melléklet), aminek az összesített eredményét az 5. táblázat szemlélteti.

4.táblázat: A sertésfajták genotípusai az M3 markerre

	SM n=24	FM n=24	VM n=24	D n=35	M×D n=12	P n=12	H n=12	NF n=12	L n=12	H39×NF n=36	NF×L n=12	V n=16
AA	24	24	24	0	2	0	0	0	0	0	0	0
AB	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	1
BB	0	0	0	35	0	12	12	12	12	36	12	15

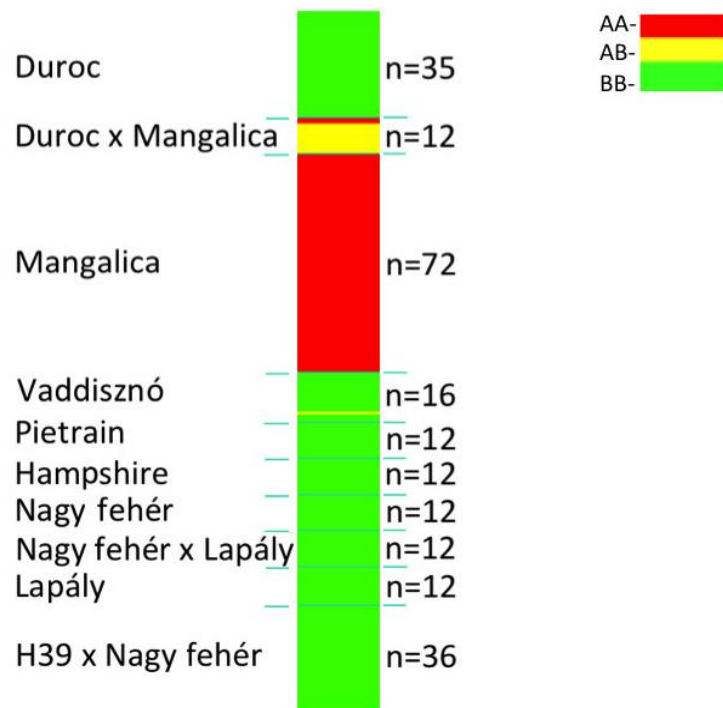
SM = Szőke mangalica; FM = Fecskehasú mangalica; VM = Vörös mangalica; D = Duroc; M×D = Mangalica×Duroc hibrid; P = Pietrain; H = Hampshire; NF = Nagy fehér; L = Lapály; H39×NF = H39×Nagy fehér hibrid; L×NF = Lapály×Nagy fehér hibrid; V = vaddisznó

5.táblázat: Allélgyakoriságok az M3 markerre

	SM N=24	FM n=24	VM N=24	D n=35	M×D n=12	P n=12	H n=12	NF n=12	L n=12	H39×NF n=36	NF×L n=12	V n=16
A 499bp	100%	100%	100%	0%	58,33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3,13%
B 808bp	0%	0%	0%	100%	41,67%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	96,87%

SM = Szőke mangalica; FM = Fecskehasú mangalica; VM = Vörös mangalica; D = Duroc; M×D = Mangalica×Duroc hibrid; P = Pietrain; H = Hampshire; NF = Nagy fehér; L = Lapály; H39×NF = H39×Nagy fehér hibrid; L×NF = Lapály×Nagy fehér hibrid; V = vaddisznó

A PCR termékek segítségével az összes vizsgált egyed genotipizálható volt. Ezt a 12. ábra mutatja, ahol a piros vagy zöld szín az adott allél homozigóta genotípusát, a sárga pedig a heterozigóta genotípust jelöli.



12. ábra: Az M3 marker genotipizálási képe

AA a mangalicára jellemző homozigóta genotípust; BB a nem mangalica fajtákra jellemző homozigóta genotípust, AB a sárgával pedig a heterozigótákat jelöli

Az eredmények alapján a mangalica fajtákban az M3 marker rövidebb alléljának a gyakorisága 100%, azaz csak ez az allél figyelhető meg. A többi sertésfajtában csak a hosszabb B allél van jelen, azok egyértelműen elkülöníthetők a mangalica-specifikus alléltól. A mangalica×duroc hibridek allélgyakoriságának aránya megközelíti az 50%-ot, ahogy az várható volt. A vizsgált vaddisznók esetén egy egyedben megtaláltuk a mangalicára jellemző allélt is. Ez azzal magyarázható, hogy a mangalica hagyományos extenzív tartása lehetővé tette a mangalicák és a vaddisznók kereszteződését.

A fajta megfeleltetésekhez az INRA GeneClass2 szoftvert használtuk. Az eddig vizsgált 231 sertés egyedből referencia-adatbázist hoztunk létre, ahol minden egyednek pontosan tudtuk a származását az állattenyésztőktől kapott törzslapok és származási lapok alapján; vaddisznók esetében pedig a hivatásos vadászok küllemi bírálata alapján. Az általam fejlesztett M3 marker mutatja a legpontosabb fajtaazonosítást a mangalica specifikus markerek között (MANGFOOD

konzorcium marker, M1, M3). A mangalica egyedeket 100%-át mangalicaként azonosítja, a többi fajta egyedeit pedig nem mangalicaként. A vaddisznó esetén a 99%-os besorolást a jelenlévő mangalica allél okozta. Ezen felül a mangalica×duroc hibridek besorolása is az elvártak megfelelő volt. Az M3 markerre vonatkoztatott besorolási eredmények a 6. táblázatban láthatók.

6. táblázat: Az M3 marker besorolási eredményei GeneClass2 szoftver alapján

	besorolás	pontszám
Kijelölt minta	1	%
Vaddisznó	Nem mangalica	99.999
Mangalica	Mangalica	100.000
Mangalica × Duroc	Mangalica × Duroc	100.000
Duroc	Nem mangalica	100.000
Pietrain	Nem mangalica	100.000
Hampshire	Nem mangalica	100.000
Nagy fehér	Nem mangalica	100.000
Lapály	Nem mangalica	100.000
H39 × Nagy fehér	Nem mangalica	100.000
Nagy fehér × Lapály	Nem mangalica	100.000

A szoftver segítségével azt is megvizsgáltam, hogy az M3 marker, egyéb, más lókuszokra tervezett mangalica markerekkel együtt, milyen hatékonyságú besorolásra képes. Azt tapasztaltam, hogy a többi fajttal együtt a vaddisznókat is 100%-ban nem mangalicaként tudta azonosítani a program (7.táblázat).

7. táblázat: A GeneClass2 szoftver alapján az M3 marker és többi mangalica marker együttes besorolási eredménye

	besorolás	pontszám
Kijelölt minta	1	%
Vaddisznó	Nem mangalica	100.000
Mangalica	Mangalica	100.000
Mangalica × Duroc	Mangalica × Duroc	100.000
Duroc	Nem mangalica	100.000
Pietrain	Nem mangalica	100.000
Hampshire	Nem mangalica	100.000
Nagy fehér	Nem mangalica	100.000
Lapály	Nem mangalica	100.000
H39 × Nagy fehér	Nem mangalica	100.000
Nagy fehér × Lapály	Nem mangalica	100.000

Az eredmények alapján létrehozott adatbázis lehetővé tette az általam fejlesztett marker elválasztási hatékonyságának (kizárási valószínűségének) meghatározását, és össze tudtuk vetni a

csoportunkban azonosított egyéb markerekkel. A mangalica markerek közül az M3 jelű 99,83%-os elválasztási hatékonyságot mutat, míg másik két markerrel együtt ez az érték 99,97% (8. táblázat). Ez azt jelenti, hogy 100 vizsgált egyedre levetítve önmagában 0,17 a többi markerrel kombinálva 0,03 a tévesztési valószínűség.

8. táblázat: A mangalica markerek elválasztási hatékonysága

		Mangalica markerek		
		M1	M2	M3
Megbízhatóság	$Af=(pm+qp)/2$	0,8333	0,9965	0,9983
Összesített megbízhatóság	$CAf=1-\Sigma 1-A$	0,9997		

6 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Új generációs szekvenálási módszerek alkalmazásával, a MANGFOOD konzorcium keretén belül, csoportunk korábban meghatározta a mangalica sertésfajták genomszekvenciáját, és ezen adatok felhasználásával több fajta-specifikus markert azonosítottak. Munkám során egy új, M3 jelű mangalica-specifikus markert találtam, ami önmagában is képes a mangalica fajta azonosítására, de a már rendelkezésre álló markerekkel kombinálva alkalmas tovább egy pontos, megbízható, gyors, gazdaságos DNS-alapú vizsgálati módszer hatékonyságának növelésére is.

Az ilyen markerekre alapozott DNS vizsgálatokkal megvalósítható mangalica termékek eredetazonosítása, nyomonkövethetősége, ami a jövőben ellenőrzési lehetőséget biztosíthat az élelmiszeripar számára hústermékeket követhetőségét az élelmiszerláncban, biztosítva ezzel a fogyasztók védelmét.

Ugyanakkor ezeknek a vizsgálatoknak fontos szerepe lehet a mangalica génmegőrzésében és a tenyészállatok genetikai ellenőrzésében.

Jelenleg a meglévő összes mangalica, vaddisznó, duroc marker egy multiplexben való optimalizálása folyik a még gazdaságosabb felhasználás érdekében.

A jövőben fontos lenne még további, a már meglévő mangalica, duroc és vaddisznó azonosítására alkalmas markereken túl, a Magyarországon fontosabb sertésfajták genetikai azonosításának megvalósítása DNS alapú módszer kidolgozása, amely a jövőben ellenőrzési lehetőséget biztosíthatna az élelmiszeripar számára, a hústermékek keverési arányának pontos felderítésére is.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

A sertéshús és hústermékek iránti mennyiségi és minőségi igények folyamatosan növekszenek, így a termelőknek új technológiákat és tenyésztési eljárásokat kell alkalmazniuk, hogy ki tudják elégíteni ezeket az igényeket.

A mangalica régi magyar fajtánk közül sokáig veszélyeztetettnek számított, hiszen a megváltozott étkezési szokások megkövetelték az intenzív jellegű sertéstartást és a nagy termelőképeségű sertésfajták kialakulását, háttérbe szorítva ezt a hagyományos fajtát. A 90-es évektől a mangalica létszám jelentős növekedésnek indult, köszönhetően a génmegőrzési programoknak, a falusi turizmusnak és növekvő gazdasági jelentőségének.

A mangalica húsa a zsírában található kedvező zsírsavösszetételének köszönhetően ízletesebb, porhanyósabb, így alkalmassá teszi prémium minőségű termékek előállítására. Ennek köszönhető, hogy egyre keresettebbé vált mind a hazai-, mind a nemzetközi piacon, mint például Spanyolország, az Amerikai Egyesült Államok és Japán.

A megnövekedett gazdasági érdeklődés és kereslet hatására megnőtt a mangalica hústermékek hamisítása is, így kiemelt fontosságú lett egy minőségellenőrzési rendszer kidolgozása.

A mangalica termékek versenyképességének növelése és ellenőrzése érdekében jött létre 2009-ben a MANGFOOD konzorcium és elindította hazánk első haszonállat genomprogramját. Meghatározta a mangalica mindhárom színváltozatának teljes genomját, és kidolgozott egy olyan DNS-diagnosztikai rendszert, amely alkalmas a mangalica termékek nyomon követésére, azok hamisításának kivédésére és a fajta tisztaságának megőrzésére.

A Sertés Genomszekvenálási Konzorcium (Swine Genome Sequencing Consortium) 2012-ben publikálta a fontosabb európai és ázsiai vad és házi sertések 55 egyedének teljes genomszekvenciáját, ami további lehetőséget biztosított szekvencia különbségek keresésére a mangalica és más sertésfajták között.

A program lezárását követően a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet, Mezőgazdasági Genomikai és Bioinformatikai Csoport munkájához csatlakozva, sikerült egy mangalica-specifikus markert fejleszteni, amely a MANGFOOD konzorcium és a csoport által fejlesztett markerekkel kombinálva 99,97%-os hatékonysággal képes gyorsan és olcsón a mangalica, duroc, vaddisznó, más fontosabb sertésfajták és ezen fajták hibridjeiknek megkülönböztetésére.

A jövőben ezek a markerszettek ellenőrzési lehetőséget biztosíthatnak az élelmiszeripar számára, a hústermékek keverési arányának pontos felderítésére, valamint fontos szerepe lehet a tenyészállatok genetikai tisztaságának ellenőrzésében is.

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ főigazgatójának, Dr. Jenes Barnabásnak, a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet korábbi és jelenlegi igazgatóinak, Dr. Burgyán Józsefnek és Dr. Bősze Zsuzsannának, valamint a Mezőgazdasági Genomikai és Bioinformatikai Csoport vezetőjének, Dr. Barta Endrének, hogy lehetővé tették számomra a jelen disszertáció elkészítéséhez szükséges kísérleti munka elvégzését.

Köszönetet mondok Dr. Bodó Szilárd belső témavezetőmnek, Dr Stéger Viktor és Dr Marincs Ferenc külső témavezetőimnek a munkám sikeres elvégzéséhez és dolgozatom megírásához nyújtott szakmai támogatásukért, segítőkészségükért és türelmükért.

Köszönöm Frank Krisztiánnak a mindennapi munkámban adott szakmai tanácsokat és a dolgozat összekuszálódott mondatainak helyes útra tereléséért.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom a családomnak, akik lehetővé tették, hogy egyetemi tanulmányaimat elvégezhessem, a nehezebb időszakban biztató szavaikból erőt meríthettem.

9 IRODALOMJEGYZÉK

- ARCHIBALD, A.L., BOLUND L., CHURCHER C., FREDHOLM M., GROENEN, M.A.M., HARLIZIUS B., LEE K-T., MILAN D., ROGERS, J., ROTHSCHILD, M.F., UENISHI, H., WANG, J., SCHOOK, L.B., THE SWINE GENOME SEQUENCING CONSORTIUM (2010): Pig genome sequence - analysis and publication strategy. *BMC Genomics* 11: 438.
- BĂCILĂ, V., ILIE, E. D., BĂCILĂ, A., VLADU, M., IȘFAN, N. (2011): Strategies for Diagnosis of Diseases in Pigs Using Molecular Markers Review. *Animal Science and Biotechnologies*, 44(1) 357
- CARATTI S., ROSSI, L., SONA, B., ORIGLIA, S., VIARA, S, MARTANO, G., TORRE, C., ROBINO, C. (2010): Analysis of 11 tetrametric STRs in wild boars for forensic purposes. *Forensic Science International: Genetics* 4. 339-342.
- CSAPÓ J., HÚSVÉTH F., CAPÓNÉ-KISS ZS., HORN P., HÁZAS Z., VARGÁNÉ-VISI É., BŐCS K. (1999): Különböző fajtajú sertések zsírájának zsírsavösszetétele és koleszterintartalma. *Acta Agraria Kaposvariensis* 3(3):1-13.
- DOVICH, NORMAN J, AND ZHANG, J. (2000): How capillary electrophoresis sequenced the human genome. *Angewandte Chemie International Edition* 39.24 4463-4468.
- EDMUNDS, S.: This little piggy had a genome. <http://blogs.biomedcentral.com/gigablog/2012/11/15/this-little-piggy-had-a-genome> (2013.09.)
- EGERSZEGI I., RÁTKY J., SOLT, L., BRÜSSOW K-P. (2003a): Mangalica-an indigenous swine breed from Hungary (Review). *Archiv für Tierzucht* 46: 245-256.
- EGERSZEGI I, SCHNEIDER F, RÁTKY J, SOÓS F, SOLT L, MANABE N, BRÜSSOW KP (2003b):. Comparison of luteinizing hormone and steroid hormone secretion during the peri-and post-ovulatory periods in Mangalica and Landrace gilts. *Journal of Reproduction and Development* 49: 291-296.
- ENDER, K. (2002): Mangalica sertések hús- és zsírtartalmának vizsgálata laboratóriumban. *A Hús*. 12. 4. 204-207 p.
- ERHARDT E, WEIMANN C (2007): Use of molecular markers for evaluation of genetic diversity and in animal production. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 15:63–66.
- FANG, X., MU, Y., HUANG, Z., LI, Y., HAN, L., ZHANG, Y., FENG, Y., CHEN, Y., JIANG, X., ZHAO W., SUN, X., XIONG, Z., YANG, L., LIU, H., FAN, D., MAO L., REN, L., LIU, CH., WANG, J., LI, K., WANG, G., YANG S., LAI, L., ZHANG, G., LI, Y. WANG, J., BOLUND, L., YANG H., WANG, J., FENG S., LI S. AND DU, Y (2012): The sequence and analysis of a Chinese pig genome. *GigaScience*. 1.1: 16.
- FLEGER, J. (1999): Das Wollschwein. Gefährdete Nutztierasse des Jahres 1999. Informationsbroschüre GEH

- GROENEN, M.A.M, ARCHIBALD, A.L. UENISHI, H. TOGGLE, C.K. TAKEUCHI, Y. ROTHSCILD, M.F., ROGEL-GAILLARD C. (2012): Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*, 491: 392-398.
- HALMY L. (2006): Elvárásaink a mangalica élelmiszer termékektől. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. (55)3. 289-292.
- HANKÓ B. (1940): Ancient domestic animals of Hungary (Ősi magyar háziállataink). Tiszántúli Mezőgazdasági Kamara, Debrecen. 160.
- HAYDEN, CH. E. (2014): Is the \$1,000 genome for real? *Nature*. doi:10.1038/nature.2014.14530 <http://www.nature.com/news/is-the-1-000-genome-for-real-1.14530> (2014 szeptember)
- HESZKY L. (2005): Növényi biológia és molekuláris növénynevelés. In: Heszy L., Fésüs L., Hornok L. (szerk): *Mezőgazdasági biotechnológia*, Agroform Kiadó, Budapest, 366 p., 196-200 p.
- HOLLÓ G., SEREGI J., ENDER K., NUERNBERG, K., WEGNER, J., SEENGER J., HOLLÓ I., REPA I. (2003) A mangalica sertések húsmínőségének, valamint az izom és a szalonna zsírsavösszetételének vizsgálata. Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar, Kaposvár. *Acta Agraria Kaposváriensis* (7)2, 19-32.
- HUI, PEI. (2014): "Next generation sequencing: chemistry, technology and applications." *Chemical Diagnostics* 1-18 p.
- JIANG, Z.H., GIBSON, J.P. (1999): Genetic polymorphisms in the leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. *Mammal Genome*, 10:191–193.
- KOH, MC, LIM, CH, CHUA, SB, CHEW, ST, PHANG, STW (1998): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints for identification of red meat animal species. *Meat Science*, 48:275–285.
- LEE, PY., COSTUMBRADO, J., HSU, CY., KIM, YH. (2012): Agarose gel elektroforesis for the separation of DNA fragment. *Journal of Visual Explorer*. doi: 10,3791/3923.
- LUGASI A., GERGELY, A., HÓVÁRI J., BARNA É., LEBOVICS V.K., KONTRASZTI M., HERMÁN, I.-NÉ., GUNDEL, J. (2006): A mangalica húsmínősége és táplálkozási jelentősége. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 2006. 55. 3. 263-276.
- MARDIS, R E. (2008): Next-generation DNA sequencing methods. *Annual. Review of Genomics and Human Genetics*. 9 387-402.
- MARDIS, R E. (2011): A decade/s perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470.7333 198-203.
- MARINCS F., MOLNÁR J., TÓTH, G., STÉGER V., BARTA E. (2013): Introgression and isolation contributed to the development of Hungarian Mangalica pigs from a particular European ancient bloodline. *Genetics Selection Evolution*, 45. Article number: 22.
- MATOLCSI J. (1975): A háziállatok eredete. *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest. 257 p. 170-174.

- MELÉNDEZ, G.I., PARDO, P.E., CAVADIA, M.T. (2014): Genetic characterization of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*) in Cerete-Colombia, using microsatellite markers. *Revista MVZ Cordoba*. (19)2
- MICKLICH, D., MATTHES, H.D. (1999): Outdoor keeping of sows of different breeds in a location of floodplain wood. *Archiv für Tierzucht* 42: 161-173.
- MIHÁLY ZS., GYÖRFFY B. (2011): Következő generációs szekvenálási technológiák kifejlődése és alkalmazásai. *Orvosi Hetilap*. 152, 55–62.
- MOHR A., UJHELYI G., MOLNÁR J., STÉGER V., TÓTH G., JÁNOSI A., SZÁNTÓ EGÉSZ R., MELLER A., NEMES A., ANTON I., MARINCS F., KOPPÁNYNÉ SZABÓ E., EGRSZEGI I., ZSOLNAI A., RÁTKY J., TÓTH P., DALLMANN K., MICSINAI (2011): A Mangalica termékek eredetvédelme molekuláris biológiai módszerekkel. <http://www.hungalimentaria.hu/Default.aspx?tabid=186> (2013 október)
- MOLNÁR J., TÓTH G., STÉGER V., ZSOLNAI A., JÁNOSI A., MOHR A., SZÁNTÓ-EGÉSZ R., TÓTH P., MICSINAI A., RÁTKY J., MARINCS F. (2012): Mitochondrial D-loop analysis reveals low diversity in Mangalica pigs and their relationship to historical specimens. *Journal Animal Breed Genetics* 130(4): 312-320.
- MOLNÁR J., NAGY T., STÉGER V., TÓTH G., MARINCS F., BARTA E., (2014): genome sequencing and analysis of Mangalica, a fatty local pig of Hungary, *BMC Genomics* 15:761
- NISTOR, ELEONORA ET AL (2012): Nutritional Quality of Pork Produced by Mangalitsa Breed. *Animal Science and Biotechnologies* (45)9.2 386-389.
- OGURTSOV, ALEKSEY Y, SHAMIL SUNYAEV, AND ALEXEY S KONDRASHOV. (2011) Indel-based evolutionary distance and mouse–human divergence. *Genome research*. (14)8. 1610-1616.
- OLLIVER L. & FOULLEY J-L. (2011): Pig genetic resources In: Rothschild M.F., Ruvinski A. (ed): *The genetics of the pig* CABI 507 p., 306-325 p.
- OVILO C., BARRAGÁN M.C., CASTELLANOS C., RODRÍGUEZ M.C., SILIÓ L. AND TORO M.A. (2000): Application of molecular markers (RAPD, AFLP and Microsatellites) to Iberian pig genotype characterization, Chiem-Options-Mediterraneennes
- PIRTY, S., ALAPETITE, A., CORNUET J.-M., PAETKAU, D., BAUDOUIN, L., ESTOUP, A. (2004): GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*. 95(6): 536–539.
- POPOVICS A., POLERECZKI ZS., SZAKÁLY Z., SZENTE V. MICSINAI A., TÓTH P. (2011): Mangalica is a unique market niche –focusing on consumer habits. *Fatty Pig, Science and Utilization International Conference, Herceghalom.*, 19.
- RÁCZ M. (1930): *A mangalica sertés bírálata és törzskönyvezése*, Pátria Irodalmi Vállalat és Nyomdai Részvénytársaság, Budapest, 59 p.

- RÁCZ M. (1932): Magyarország mangalica sertés tenyésztése, Pátria Irodalmi Vállalat és Nyomdai Részvénytársaság, Budapest, 31 p.
- RADNÓCZI L. (2002): A mangalica fajta kialakulása és értékei. Debrecen Kiadó Debreceni Egyetem Agrártudományi Centrum
- RADNÓCZI L.(2006): A fajtatípusa mangalica standardja. Állattenyésztés és Takarmányozás. (55)3. 225-232.
- RÁTKY J, BRÜSSOW KP, EGERSEGI I, TORNER H, SCHNEIDER F, SOLT L, MANABE N (2005) Comparison of follicular and oocyte development and reproductive hormone secretion during the ovulatory period in Hungarian native breed, Mangalica, and Landrace gilts. Journal Reproduction Development 2005(51): 427-432.
- ROBINSON, J. T., THORVALDSDÓTTIR H., WINCKLER, W., GUTTMAN, M., LANDER, E. S., GETZ, G., MESIROV, J. P. (2011): Integrative Genomics Viewer. Nature Biotechnology 29: 24–26.
- ROMANOV, MN, WEIGEND, S. (2001): Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. Poultry Science. 80(8):1057-1063.
- SANGER, F., COULSON, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of Molecular Biology 94(3):441–448.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. PNAS 74(12):5463-5467.
- SCHOOK, B. L., BEEVER, E.J., ROGERS, J., HUMPHRAY, S., ARCHIBALD, A., CHARDON, P., MILAN, D., ROHRER, G., EVERSOLE, K. (2005): Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. Comparative and Functional Genomics 2005(6): 251-255.
- SHOKRALLA S., SPALL J. L., GIBSON J. F., HAJIBABAEI M. (2012): Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. Molecular Ecology 21 (8):1794–1805.
- SZABÓ P (2000): Bízató mangalica keresztezések. Biokultúra 2000/3
http://www.biokontroll.hu/cms/index.php?option=com_content&view=article&id=1416%3Abizato-mangalica-keresztesek&catid=283%3Aallattartas&Itemid=127&lang=hu
- SZABÓ P. (2006) A mangalica reneszánsza. Állattenyésztés és takarmányozás, 55. 203–216.
- TENEVA, A. (2009): Molecular markers in animal genome analysis. Biotechnology in Animal Husbandry 25 (5-6). 1267-1284.
- TENEVA, A., DIMITROV K., PETROVIĆ, CARO V., PETROVIĆ, M.P., DIMITROVA I.N.T., PETROV N.(2013): Molecular genetics and SSR markers as a new practice in farm animal genomic analysis for breeding and control of disease disorders. Biotechnology in Animal Husbandry, Institute for Animal Husbandry, Belgrade-Zemun 29(3). 405-429.

- TÓTH P. (2006): Tartástechnológia és ennek jelentősége a tenyésztésben és az exportban. Állattenyésztés és Takarmányozás. (55)3. 232.
- TÓTH P. (2009): Mangalica – egy ősi fajta új utakon. V. Táplálkozásmarketing Konferencia előadások összefoglalói, Kaposvár, 31.
- TÓTH T., BOROS CS., ZSÉDELY E., VIRÁG GY., SCHMIDT J. (2009)A magyar nagyfehér x magyar lapály és a szőke mangalica húsának táplálkozásbiológiai értéke biotartási-, és takarmányozási körülmények között. Állattenyésztés és takarmányozás, 58(4). 549–563.
- TÖRÖK Á. (2011): Spanyolul tanul a magyar mangalica! Gazdálkodás, 55(4): 412-420.
- UENISHI, H., MOROZUMI, T., KANAMORI, H., EGOUCHI-OGAWA, T., FUJISHIMA-KANAYA, N., MATSUMOTO, T., MIKAWA, A., OKUMURA, N., HIROKI SHINKAI, H., SUZUKI, K., TANAKA-MATSUDA, M., TOKI D., BITO T., FUJITSUKA N., KAMIYA, K., KURITA, K., KIKUTA A., YAMAGATA, H. (2009):Completion of draft sequencing of the pig genome. Research Highlights FY 2006-2010
- VIGNAL, A., MILAN D., SANCRISTOBAL M., EGGEN A. (2002): A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genetics Selection Evolution. (34)275, 305-275.
- VOELKERDING K. V., SHALE A. D., DURTSCHI J. D. (2009): Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. Clinical Chemistry. 55(4):641-658.
- VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., REIJANS M., LEE T., HORNES M., FRUITERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. AND ZABEAU M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. Vol. 23, No. 21 4407-4414
- WALTERS, M.E., WOLF, E., WHYTE1, J.J., MAO1, J., RENNER, S., NAGASHIMA, N., KOBAYASHI, E., ZHAO, J., WELLS, D.K., CRITSER, K.J., RILEY, K.L. AND PRATHER, S.R. (2012) Abstract "Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model." BMC Medical Genomics. 5.1 (2012): 55.
- WEAVER R. F., HEDRICK P. W. (2000):Genetika. Panem. 384-387.
- WERNERSSON, R., SCHIERUP H.M., JØRGENSEN G F, GORODKIN, J, PANITZ ,F, STÆRFELDT, H-H., CHRISTENSEN, F.O., MAILUND, T, HORNSHØJ, H, KLEIN A, WANG, J., LIU, B., HU S., DONG, W., LI, W., WONG, K.S.G., YU, J., WANG, J., BENDIXEN, CH., FREDHOLM, M., BRUNAK, S., YANG, H. AND BOLUND, L. (2005): Pigs in sequence space: a 0.66 X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. BMC Genomics (6)1 70.
- WILKINSON, S., ARCHIBALD, A.L., HALEY, C.S., MEGENS H.-J., CROOIJMANS R.P.M.A, GROENEN M.A.M., WIENER P., OGDEN R. (2012): Development of a genetic tool for product regulation in the diverse British pig breed market. BMC Genomics 13: 580
- YALCIN, B., WONG, K., AGAM, A., GOODSON, M., KEANE, T. M., GAN, X., NELLÅKER, CH., GOODSTADT, L., NICOD, J., BHOMRA, A., HERNANDEZ-PLIEGO, P., WHITLEY, H., CLEAK, J., DUTTON, R., JANOWITZ, D., MOTT, R., ADAMS,

D. J., AND FLINT, J. (2012):, Sequence based characterization of structural variation in the mouse genome. Nature. 477(7364): 326–329.

YANG, W, KANG, X, YANG, Q, LIN, Y AND FANG, M. (2013): Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. Journal of Animal Science and Biotechnology, 4:2.

ZHANG, Z. D., DU J., LAM, H., ABYZOV, A., URBAN, A. E., SNYDER, M. AND GERSTEIN, M. (2011): Identification of genomic indels and structural variations using split reads BMC Genomics 12:375

ZICHNER, T., GARFIELD D. A., RAUSCH, T., STÜTZ, A.M., CANNAVO, E., BRAUN, M., FURLONG, E. E.M., AND. KORBELET, J. O. (2013): Impact of genomic structural variation in *Drosophila melanogaster* based on population-scale sequencing Genome Research. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 23: 568-579.

ZSOLNAI A., RADNÓCZY L., FÉSÜS L., ANTON I. (2006): Do Mangalica Pigs of Different Colours Really Belong to Different Breeds? Archiv für Tierzucht 49: 477-483.

ZSOLNAI A., TÓTH G., MOLNÁR J., STÉGER V., MARINCS F., JÁNOSI A., UJHELYI G., KOPPÁNYNÉ SZABÓ E., MOHR A., ANTON I., SZÁNTÓ-EGÉSZ R., EGERSZEGI I., DALLMANN K., TÓTH P., MICSINAI A., BRÜSSOW K., RÁTKY J. (2013): Looking for breed differentiating SNP loci and for a SNP set for parentage testing in Mangalica. Archiv für Tierzucht 56: 200-207.

HTTP1: <http://www.mangalicatenyesztok.hu/fajtak.html>

HTTP2: <http://www.mangalicatenyesztok.hu/genmegorzes.html> (2014 augusztus)

HTTP3: http://www.mangalicatenyesztok.hu/tenyesztesi_program.html (2014 szeptember)

HTTP4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=pig> (2014 október)

HTTP5: <http://www.piggenome.org/> (2013 október)

HTTP6: http://www.mangfood.hu/page.php?id=4_1010 (2013 szeptember)

HTTP7: <http://www.mayomedicallaboratories.com/articles/communique/2010/05.html> (2014 július)

HTTP8: <http://res.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet-hiseq-x-ten.pdf> (2014 június)

10 MELLÉKLET

I. melléklet:

Plate I.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Szőke mangalica	A	2	3	4	11	19	23	24	29	30	35	36	37
Szőke mangalica kanok	B	1090	1094	1100	1102	1104	1105	1108	1109	1157	1167	1168	1169
Fecskehasú mangalica	C	15	25	27	32	33	40	48	60	64	70	73	75
Fecskehasú mangalica kanok	D	1093	1095	1096	1098	1107	1110	1112	1114	1159	1160	1161	1162
Vörös mangalica	E	13	14	22	31	38	43	58	61	65	602	608	609
Vörös mangalica kanok	F	1091	1092	1097	1101	1106	1111	1113	1164	1165	1166	1170	1171
Duroc	G	20	21	205	206	207	208	209	210	211	598	599	600
Duroc, 3 db DxM	H	1115	1116	1117	1172	1078	1079	1080	1081	1082	671DxM	672 DxM	674 DxM

II. melléklet:

Plate II.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pietrain	A	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517
Hampshire	B	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529
Nagy fehér	C	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245
Mangalica x duroc, más fajok	D	658	659	660	666	667	673	1183 ló	1209 tyúk	1221 pulyka	1239 kacsa	1255 lúd	1146 szarvas
H39 x nagy fehér_1	E	303	304	305	306	307	308	309	310	311	313	314	315
H39 x nagy fehér_2	F	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053
H39 x nagy fehér_3	G	316	317	318	319	320	321	322	1054	1055	1056	1057	1058
Nagy fehér x lapály	H	1066	1067	1068	290	291	292	294	295	296	297	298	302

III. melléklet:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Duroc szőr	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310		
Lapály	214	215	1069	1070	1072	1073	1074	1075	1076	1077	555	554				
Vaddisznó	342	350	356	357	359	495	497	499	500	501	503	610	611	612	996	997

IV. melléklet: Allélgyakoriságok az M3 markerre

	Szőke mangalica		Fecskehasú mangalica		Vörös mangalica		Duroc	
	Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus
	2	AA	15	AA	13	AA	20	BB
	3	AA	25	AA	14	AA	21	BB
	4	AA	27	AA	22	AA	205	BB
	11	AA	32	AA	31	AA	206	BB
	19	AA	33	AA	38	AA	207	BB
	23	AA	40	AA	43	AA	208	BB
	24	AA	48	AA	58	AA	209	BB
	29	AA	60	AA	61	AA	210	BB
	30	AA	64	AA	65	AA	211	BB
	35	AA	70	AA	602	AA	598	BB
	36	AA	73	AA	608	AA	599	BB
	37	AA	75	AA	609	AA	600	BB
	1090	AA	1093	AA	1091	AA	1115	BB
	1094	AA	1095	AA	1092	AA	1116	BB
	1100	AA	1096	AA	1097	AA	1117	BB
	1102	AA	1098	AA	1101	AA	1172	BB
	1104	AA	1107	AA	1106	AA	1078	BB
	1105	AA	1110	AA	1111	AA	1079	BB
	1108	AA	1112	AA	1113	AA	1080	BB
	1109	AA	1114	AA	1164	AA	1081	BB
	1157	AA	1159	AA	1165	AA	1082	BB
	1167	AA	1160	AA	1166	AA	1297	BB
	1168	AA	1161	AA	1170	AA	1298	BB
	1169	AA	1162	AA	1171	AA	1299	BB
							1300	BB
							1301	BB
							1302	BB
							1303	BB
							1304	BB
							1305	BB
							1306	BB
							1307	BB
							1308	BB
							1309	BB
							1310	BB
		</						

H39 x Nagy fehér		Nagy fehér x lapály		Lapály		Vaddisznó	
Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus
303	BB	1066	BB	214	BB	342	BB
304	BB	1067	BB	215	BB	350	BB
305	BB	1068	BB	1069	BB	356	BB
306	BB	290	BB	1070	BB	357	BB
307	BB	291	BB	1072	BB	359	BB
308	BB	292	BB	1073	BB	495	BB
309	BB	294	BB	1074	BB	497	BB
310	BB	295	BB	1075	BB	499	BB
311	BB	296	BB	1076	BB	500	BB
313	BB	297	BB	1077	BB	501	BB
314	BB	298	BB	555	BB	503	BB
315	BB	302	BB	554	BB	610	AB
1042	BB					611	BB
1043	BB					612	BB
1044	BB					996	BB
1045	BB					997	BB
1046	BB						
1047	BB						
1048	BB						
1049	BB						
1050	BB						
1051	BB						
1052	BB						
1053	BB						
316	BB						
317	BB						
318	BB						
319	BB						
320	BB						
321	BB						
322	BB						
1054	BB						
1055	BB						
1056	BB						
1057	BB						
1058	BB						
n=36		n= 12		n=12		n=16	

Allélfrekvencia				
A (499 bp)	0%	0%	0%	3,13%
B (808 bp)	100%	100%	100%	96,87%

Pietrain		Nagy fehér		Hampshire		Mangalica x Duroc	
Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus	Biobanki azonosító	Genotípus
506	BB	234	BB	518	BB	658	AB
507	BB	235	BB	519	BB	659	AB
508	BB	236	BB	520	BB	660	AB
509	BB	237	BB	521	BB	666	AB
510	BB	238	BB	522	BB	667	AB
511	BB	239	BB	523	AB	673	AB
512	BB	240	BB	524	BB	671	AA
513	BB	241	BB	525	BB	672	AA
514	BB	242	BB	526	BB	674	AB
515	BB	243	BB	527	BB	656	AB
516	BB	244	BB	528	BB	657	AB
517	BB	245	BB	529	BB	661	AB
n= 12		n=12		n=12		n=12	
Allélfrekvencia							
A (499 bp)		0%		0%		58,33%	
B (808 bp)		100%		100%		41,67%	

11 NYILATKOZAT

Alulírott _____, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar _____ szak nappali/levelező tagozatvégzős hallgatója nyilatkozom, hogy a dolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy szakdolgozatom/diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet /Szak honlapjára. A digitális verzióban (pdf formátumban) leadott dolgozatom elérhető legyen a témát vezető tanszéken/intézetben, illetve a kialakításra kerülő Kari központi nyilvántartásában, a jogi és etikai szabályok teljes körű betartása mellett.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, _____ év _____ hó _____ nap

hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot/diplomadolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmak korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot/diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, _____ év _____ hó _____ nap

témavezető aláírása